

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
JOÃO VITOR BURTET

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Streptococcus agalactiae* EM PACIENTES
ATENDIDOS NO HU/UFSC**

Florianópolis
2019

João Vitor Burtet

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Streptococcus agalactiae* EM PACIENTES
ATENDIDOS NO HU/UFSC**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia. Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo.

Florianópolis

2019

RESUMO

Introdução: *Streptococcus agalactiae* é parte da microbiota gastrointestinal de humanos, um reconhecido agente causador de infecções em neonatos e gestantes, que vem ganhando importância como agente de infecções em adultos. O microrganismo, associado frequentemente à doença neonatal (meningite e sepse), nas últimas décadas ganhou importância como agente de infecções especialmente em tecidos e partes moles, causando dentre outras, lesões necróticas como gangrena e fascíte. As infecções em adultos acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, dentre os quais destacam-se pacientes com Diabetes Mellitus. **Objetivo:** Identificar os diferentes sorotipos de *S. agalactiae* isolados de infecções em pacientes atendidos no HU/UFSC/EBSERH, associando aos diferentes sítios anatômicos. **Metodologia:** Foram incluídos no estudo 36 isolados clínicos de *S. agalactiae* recuperados de diversos sítios anatômicos como agentes de infecção. A identificação dos sorotipos foi realizada por metodologia molecular, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-Multiplex). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) que amplificam regiões específicas das cápsulas polissacarídicas (CPS) da bactéria que possibilitam realizar a determinação dos diferentes sorotipos capsulares. **Resultados:** O sorotipo V foi predominante, representando 56% dos isolados, seguido pelos sorotipos II (22%), Ia (16%) e Ib e III, sendo 3% cada um. Os isolados provenientes de tecido tiveram maior ocorrência, e o sorotipo mais isolado nesse sítio foi o V. A idade avançada foi um dos fatores que esteve presente em boa parte dos isolados, principalmente os advindos de tecidos e Diabetes Mellitus mostrou-se um importante fator de risco. A partir dos resultados obtidos foi possível verificar a variabilidade regional dos sorotipos associados à infecção.

PALAVRAS-CHAVE: *Streptococcus agalactiae*. Sorotipagem por PCR. Sorotipos capsulares. Beta-hemolítico.

ABSTRACT

Background: *Streptococcus agalactiae* is part of the human gastrointestinal microbiota, an agent that causes infection in neonates and pregnant women, which has been becoming an important agent of infection in adults. The microorganism, often associated with neonatal disease (meningitis and sepsis), has gained importance in recent decades as an agent of infections especially in tissues and soft tissues, causing, among others, necrotic lesions such as gangrene and fasciitis. Adults infection mainly affect immunocompromised individuals, such as patients with Diabetes Mellitus. **Aims:** To identify the different serotypes of *S. agalactiae* isolated from infections in patients treated at HU / UFSC / EBSEH, associating the different anatomical sites. **Methods:** 36 clinical isolates of *S. agalactiae* recovered from several anatomical sites as infection agents were included in the study. Serotype identification was performed by molecular methodology, using Polymerase Chain Reaction (PCR-Multiplex). Initiating oligonucleotides (primers) were used to amplify specific regions of the polysaccharide capsules (PSC) of the bacterium that allow the determination of the different capsular serotypes. **Results:** Serotype V was predominant, representing 56% of the isolates, followed by serotypes II (22%), Ia (16%) and Ib and III, with 3% each. Tissue isolates had a higher occurrence, and the most isolated serotype in this site was V. Elderly age was one of the factors that was present in a good part of the isolates, especially those coming from tissues and Diabetes Mellitus showed to be an important risk factor. From the obtained results it was possible to verify the regional variability of the serotypes associated with the infection.

KEYWORDS: *Streptococcus agalactiae*. PCR serotyping. Capsular serotypes. Beta-hemolytic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação de colônias Alfa-hemolítica (a), Beta-hemolítica (b) e Gama-hemolítica (c)..... 13
- Figura 2.** Gel de agarose representando produtos amplificados na eletroforese para o gene *cfb*..... 20
- Figura 3.** Gel de agarose representando produtos amplificados na eletroforese para multiplex A (Sorotipos Ia, Ib, II, III e IV para *S. agalactiae*)..... 21
- Figura 4.** Gel de agarose representando produtos amplificados por eletroforese pela multiplex B (Sorotipos V, VI, VII, VIII e IX para *S. agalactiae*) 21
- Figura 5.** Representação dos sorotipos identificados nos isolados do estudo..... 22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados na Multiplex A para os sorotipos Ia, Ib, II, III e IV e Multiplex B para os sorotipos V, VI, VII, VIII e IX 16

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes *cfb* e *atr* 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos sítios anatômicos com o número de isolados em cada sítio e a faixa etária, respectivamente..... 19

Tabela 2. Relação dos sítios anatômicos com o número de isolados em cada sítio e a faixa etária, respectivamente 20

Tabela 3. Origem dos isolados e seus respectivos sorotipos..... 23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.3 Objetivos específicos.....	11
3. JUSTIFICATIVA.....	12
4. METODOLOGIA.....	13
4.1 Critério de inclusão.....	13
4.2 Identificação.....	13
4.3 Subcultivo.....	14
4.4 Extração de DNA.....	14
4.5 PCR multiplex para detecção dos sorotipos capsulares.....	14
4.6 PCR para detecção dos genes constitutivos <i>atr</i> e <i>cfb</i>	16
5.RESULTADOS.....	18
5.1 Fluxograma de trabalho.....	18
5.2 Descrição das amostras.....	18
5.3 Detecção dos genes constitutivos <i>atr</i> e <i>cfb</i> em <i>S. agalactiae</i>	20
5.4 Detecção molecular dos sorotipos capsulares de <i>S. agalactiae</i>	20
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO.....	28
8. REFERENCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae, também conhecido como Estreptococo beta-hemolítico do grupo B de Lancefield (EGB), tem como característica células esféricas ou ovóides que se apresentam aos pares ou em cadeias. São imóveis, não esporulados e anaeróbios facultativos. A caracterização do microrganismo é realizada com base em marcadores sorológicos e imunológicos, sendo eles: antígeno polissacarídico da parede celular (antígeno do grupo B); proteínas de superfície, sendo o antígeno c, a mais comum; e dez polissacarídeos capsulares, os quais são tipos específicos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX) (MURRAY, 2009).

A identificação laboratorial de EGB é baseada nas características da colônia, que geralmente é beta-hemolítica, além dos **testes de catalase** negativo e **CAMP positivo** (KONEMAN, 2018). O microrganismo pode ser identificado também por testes de aglutinação em látex. Essa metodologia é amplamente utilizada para identificação e triagem não só de EGB, mas também de outros microrganismos de importância clínica (JOHRI et al, 2013), como *Staphylococcus aureus* (IDELEVICH et al., 2014), *Eschericia coli* (HUANG et al., 2001) e *Burkholderia pseudomallei* (SUTTISUNHAKUL et al., 2015), por exemplo. *S. agalactiae* tem sido associado a infecções em grupos populacionais distintos como gestantes, recém-nascidos e idosos, além de pacientes com debilidades crônicas como cirrose hepática, neoplasias, insuficiência renal e diabetes mellitus que se destaca pela complicação nos tecidos moles das extremidades inferiores. (KONEMAN et al., 2008). EGB coloniza a pele, trato respiratório, tubo digestivo e o aparelho urogenital de muitos indivíduos saudáveis (PINTO et al., 2017). Essa colonização do trato gastrointestinal inferior e trato geniturinário em gestantes está associada ao maior risco de infecção do neonato principalmente em casos de ruptura precoce da membrana amniótica, partos prolongados ou prematuros (MURRAY, 2009).

A prevalência da colonização em gestantes varia entre 10% e 30% e pode ser transitória. Aproximadamente 50% dos neonatos de mães colonizadas, que não realizam profilaxia intraparto, tornam-se colonizados por EGB. Entre os neonatos colonizados, estima-se que aproximadamente 1-2% irão desenvolver infecção de início precoce, geralmente nos primeiros dias de vida, comumente progredindo para sepse (ALP et al., 2016; BASTOS et al., 2012; SOARES et al., 2013). A sepse é definida como uma bacteremia com sinais de comprometimento hemodinâmico e resposta inflamatória sistêmica (BENINCÁ et al., 2013).

Até meados dos anos 80, a infecção por esse microrganismo era vista como prevalente apenas em neonatos e gestantes, sendo considerados raros os casos de infecção em adultos com perfil diferente (não-gestantes) (FREY et al. 2011). Mais recentemente, infecções de pele

e tecidos moles, infecções osteo-articulares, respiratórias e urosepse, têm sido frequentemente associadas a EGB em pacientes adultos. Relatos de meningite e endocardite por esse microrganismo têm sido geralmente relacionados a algum tipo de imunossupressão (FARLEY, 2001). Além disso, relatos de aumento na incidência de infecções por EGB também têm sido descritos em pacientes transplantados e hemodialisados (SANTORO-LOPES; HALPERN; GONÇALVES, 2005).

No Brasil, foi relatado um caso de endocardite aguda por este microrganismo, em paciente feminina sem patologia prévia, que evoluiu a óbito (JÚNIOR et al., 2005). Recentemente, foi relatado o caso de paciente do sexo masculino, de meia idade (48 anos), imunocompetente, sem histórico de comorbidade crônica, diagnosticado com endocardite por EGB que também evoluiu para óbito (YA'QOUB et al., 2018).

Infecções invasivas por *S. agalactiae* em adultos imunocomprometidos não-gestantes vêm aumentando sua frequência especialmente em pacientes diabéticos, sendo esta a comorbidade mais comum, presente em 20-25% dos adultos não gestantes com infecção por EGB (FARLEY, 2001). Lança, Serrano e Barata (2006) relataram o caso de um paciente diabético com infecção múltipla por EGB, incluindo endoftalmite unilateral, artrite séptica, empiema pleural e celulite. Batista et al. (2015) descreveram um caso de sepse por *S. agalactiae* no qual o paciente diabético e cirrótico evoluiu a óbito, sendo que o microrganismo foi isolado em culturas de líquido, urina e sangue do paciente. Panikkath et al. (2016) relataram outro caso de paciente também diabético diagnosticado com piomiosite por EGB que foi severamente afetado pela infecção. No trato urinário, EGB pode causar desde bacteriúria, cistite sem complicações, até pielonefrite (ULETT et al, 2009). Unnikrishman et al. (2018) relataram um caso de piomiosite paraespinal secundária à infecção do trato urinário por *S. agalactiae*.

EGB foi identificado em pacientes com câncer (94% em tumores sólidos e 6% distúrbios hematológicos) nas seguintes condições: durante o uso de dispositivos médicos internos (cateteres), cirurgias, transfusões, traqueostomias, radioterapia, quimioterapia e neutropenia. A infecção intravenosa por *S. agalactiae* ocorreu principalmente em pacientes de tumores sólidos (PIMENTEL et al., 2016).

O potencial patogênico e virulência de *S. agalactiae* é variável, podendo ser relacionada a estrutura capsular. Estudos têm demonstrado a associação de alguns sorotipos com quadros clínicos específicos, e até mesmo, com diferentes perfis de sensibilidade. Nos EUA, o sorotipo Ia tem sido responsável pela maioria dos casos de infecção de início precoce em recém-nascidos, já o sorotipo III, por infecção tardia. O sorotipo V, é particularmente

resistente a macrolídeos e, geralmente, é responsável por infecções em idosos ou pacientes imunocomprometidos; por outro lado o sorotipo IV tem emergido na América do Norte e em diversas outras regiões do mundo como agente de infecções neonatais e infecções invasivas em adultos, estando também relacionado à resistência à eritromicina, clindamicina e à tetraciclina (PERSSON et al., 2004).

Na América do Norte, os sorotipos Ia, Ib, II, III e V são os mais frequentemente associados à infecções invasivas (RAABE; SHANE, 2019). No Brasil, Dutra e colaboradores (2014) em estudo com isolados de diversas regiões do país, descreveram alta prevalência dos sorotipos Ia e II. Dentre os 10 sorotipos, o maior potencial infectante está nos sorotipos: Ia, Ib, II, III e V (STEVENS, 2000).

A caracterização dos sorotipos de EGB pode ser realizada por métodos moleculares, ou por precipitação capilar (baseada nos antígenos capsulares) (LANCEFIELD, 1934), coaglutinação (HAKASSON, 1992), imunodifusão dupla (JOHNSON; FERRIERI, 1984), métodos de ensaio imunoenzimático (ARAKERE et al., 1999) e aglutinação em látex (PARK, 2001).

Em todos esses métodos há a possibilidade de alguns isolados não serem identificados ou classificados adequadamente devido a alguns fatores como diminuição na capacidade de sintetização ou expressão da cápsula polissacarídica (YAO et al., 2012), mutação nos genes da biossíntese do operon capsular ou devido à expressão de um polissacarídeo não caracterizado, para o qual anticorpos ainda não se encontram disponíveis (JOHRI et al., 2013).

As metodologias sorológicas podem falhar na tipagem de um isolado em função da baixa expressão da CPS, além do fato dessas metodologias serem dependentes da qualidade dos anticorpos empregados e da experiência do profissional que irá executá-la (IMPERI et al., 2010). Em alguns estudos, os isolados tipados por aglutinação em látex apresentaram um resultado não satisfatório, como no caso do estudo de Brigtsen et al. (2014) no qual dos 446 isolados tipados por látex, 13,8% não foram classificados em sorotipos. Além do estudo realizado por Yao et al. (2012), no qual entre os 281 isolados testados por aglutinação em látex, 27% não puderam ser tipados.

A tipagem molecular, via gene capsular, é considerada uma boa alternativa para sorotipagem de *S. agalactiae*. Recentemente vários protocolos para tipagem baseados em PCR/PCR multiplex para os genes do operon capsular têm sido publicados (IMPERI et al., 2010; YAO et al., 2013; FURFARO et al., 2017; OTAGUIRI et al., 2018).

O tratamento para infecções por *S. agalactiae* utiliza principalmente antimicrobianos beta-lactâmicos como as penicilinas e ampicilinas, que são considerados opções de primeira escolha. Ainda não há relatos de resistência da bactéria a essa classe de antimicrobianos, porém já existem relatos de isolados com concentração inibitória mínima no limite de sensibilidade (PHARES et al, 2008). A realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) é necessária somente quando o tratamento não pode ser realizado com beta-lactâmicos, como em casos de tratamento de pacientes alérgicos. Nessas situações as principais opções terapêuticas são os macrolídeos e lincosamidas, os quais vêm perdendo sensibilidade gradativamente em todo o mundo (PINTO et al., 2013).

Frente ao gradativo aumento da resistência aos antimicrobianos de segunda escolha como a clindamicina e a eritromicina, uma promissora alternativa de tratamento vem sendo testada. Cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas na África do Sul e na Namíbia mostraram alta sensibilidade aos óleos essenciais e extratos etanólicos de *Olea europaea*. (MUKESI et al., 2019). Os óleos essenciais de *O. europaea* mostraram atividade bactericida contra EGB de 33,3 mg/ml, estudos têm mostrado que os óleos essenciais têm atividade bactericida para um amplo espectro de bactérias (HASHMI et al., 2015; DARSANAKI et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar por metodologia molecular os sorotipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* isolados de infecções em pacientes adultos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os sorotipos capsulares de *S. agalactiae* isolados de infecções em pacientes no HU-UFSC por PCR multiplex;
- Avaliar os principais sítios anatômicos associados a infecções por *S. agalactiae*;
- Correlacionar os sítios de infecção com os sorotipos de *S. agalactiae*;

3. JUSTIFICATIVA

S. agalactiae, inicialmente associado a casos de meningite e sepse neonatal, bem como parto prematuro e aborto, atualmente tem se mostrado um importante patógeno em adultos não-gestantes, causando infecções numa grande variedade de sítios anatômicos, tendo relação direta com fatores de imunossupressão.

A distribuição dos sorotipos parece variar conforme a região e os grupos populacionais estudados. A associação entre os sorotipos e quadros clínicos/sítios anatômicos específicos, ou mesmo, a diferentes perfis de sensibilidade ainda permanece incerta. Por isso, é de grande importância a realização de estudos regionais, utilizando metodologias sensíveis e específicas, para determinar os principais sorotipos circulantes e associá-los aos quadros clínicos e sítios anatômicos específicos. O presente estudo pretende melhorar a compreensão das características epidemiológicas associadas a infecções por EGB em pacientes adultos no Hospital Universitário/UFSC.

4 METODOLOGIA

4.1 Critérios de inclusão

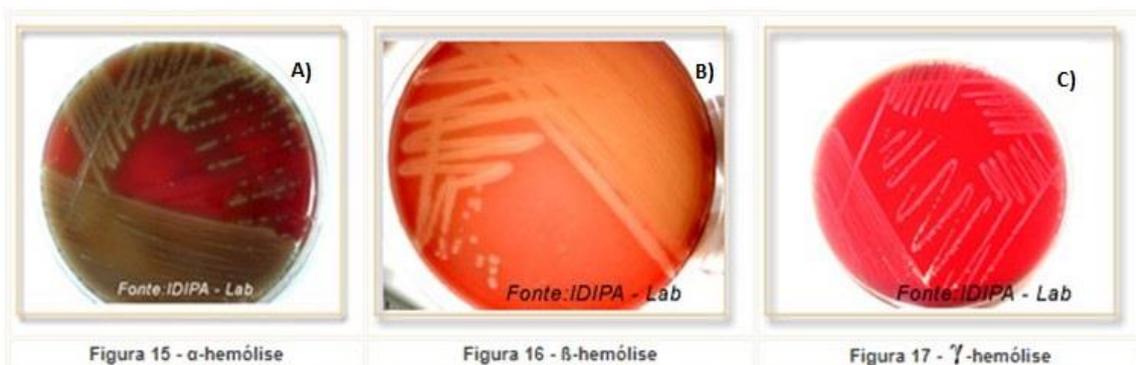
Foram selecionados todos os isolados de EGB, armazenados no banco de bactérias do setor de microbiologia da DACL/HU/UFSC, associados à infecção no período de março de 2018 e março de 2019.

4.2 Identificação

As culturas foram processadas conforme procedimentos padronizados no setor de microbiologia. Colônias beta-hemolíticas (lise completa das hemácias) ou não hemolíticas foram identificadas por provas de catalase, CAMP teste, aglutinação em latex para o grupo B de Lancefield ou cartão para gram positivos em equipamento automatizado (Vitek 2 BioMérieux), seguindo a rotina do setor.

S. agalactiae em cerca de 1-2% dos isolados (MURRAY, 2009) pode apresentar características gama-hemolíticas (ausência de hemólise), não causando modificação no meio de ágar sangue. Representação, Figura 1.

Figura 1. Imagens representativas de Alfa-Hemólise (a); Beta-Hemólise (b) e Gama-Hemólise (c).



S. agalactiae é negativo para o **teste da catalase**, neste teste utiliza-se uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% e observa-se possível produção e liberação de oxigênio, caracterizada pela formação de bolhas.

A identificação foi realizada pela positividade no **teste de CAMP** (Christie, Atkins, Munch-Petersen), para o qual verifica-se a potencialização da hemólise em ágar sangue de carneiro, cruzando de forma perpendicular uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de beta-hemolisina, com isolados de *S. agalactiae* produtores de uma proteína denominada de

fator CAMP. Resultados positivos produzem intensificação da hemólise na forma de ponta de seta, reação característica de *S. agalactiae* (KONEMAN, 2018).

Para isolados provenientes de sítios anatômicos estéreis, a confirmação da identificação foi realizada por metodologia automatizada (VITEK 2 – Biomerieux).

Os isolados foram identificados numericamente, e em casos em que o paciente possuía isolados de diferentes sítios anatômicos ou quando a extração do DNA foi realizada em diferentes morfologias coloniais, foi identificado também o local da coleta ou subdivido em a, b ou c, respectivamente.

4.3 Subcultivo

As amostras do banco microbiológico, armazenadas em caldo BHI com 20% de glicerol em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram repicadas em ágar base columbia com 5% de sangue de carneiro, incubadas em estufa microbiológica a temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 24 horas. As colônias foram avaliadas quanto à pureza dos isolados e posteriormente utilizadas para os testes genotípicos.

4.4 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de uma suspensão bacteriana em PBS estéril, utilizando microtubo de 1,5mL, de culturas puras com crescimento de no máximo 24 horas. A suspensão foi aquecida a 100°C por 15 minutos e, posteriormente, centrifugada a 21000 rcf por um minuto. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (USEIN et al., 2014).

4.5 PCR multiplex para detecção dos sorotipos capsulares

Foi feita a determinação molecular dos sorotipos capsulares de *S. agalactiae* utilizando duas PCR multiplex. Esta determinação é feita utilizando iniciadores para genes específicos para os diferentes tipos de cápsulas polissacarídicas (CPS) encontradas nos sorotipos de *S. agalactiae*.

Duas reações de PCR multiplex foram realizadas segundo método descrito por Poyart et al. (2007) e Imperi et al. (2010), com algumas modificações padronizadas previamente em nosso laboratório. As duas reações multiplex foram identificadas como A e B, e os iniciadores foram separados com base no tamanho dos produtos amplificados, segregando aqueles que

possuíam tamanhos semelhantes, o que dificultaria sua diferenciação por eletroforese em gel de agarose.

A PCR multiplex A foi realizada para detecção dos genes (sorotipos): *cps1aH* (Sorotipo Ia), *cps1bJ/K* (Sorotipo Ib), *cps2K* (Sorotipo II); *cps1a/2/3IJ* (Sorotipo III) e *cps4N* (Sorotipo IV). A PCR multiplex B, foi realizada para os genes: *cps5O* (Sorotipo V); *cps6I* (Sorotipo VI); *cps7M* (Sorotipo VII); *cps8J* (Sorotipo VIII); *cpsI-7-9* (Sorotipo IX). As modificações padronizadas foram feitas por Eduardo Venâncio Alves durante a realização de sua dissertação de Mestrado (2018).

As duas reações foram realizadas em volume final de 25 µL cada, utilizando as seguintes concentrações de reagentes: 3 mM de MgCl₂; 250 nM de cada iniciador, exceto para os iniciadores correspondentes aos sorotipos III e IX, os quais foram utilizados na concentração de 400 nM; 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato; Glicerol 2,5%; 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e KCl 50 mM; 5,0 µL de DNA do isolado e 1U da enzima Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, EUA).

A amplificação foi feita com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguidos por 15 ciclos de 94 °C por 60 s, 54 °C por 60 s, e 72 °C por 2 min, e então por mais 25 ciclos de 94 °C por 60 s, 56 °C por 60 s, e 72 °C por 2 min, e um ciclo final de 72 °C por 10 min. Nas duas reações a adição de glicerol a 5% do volume total, objetivou baixar as temperaturas de hibridização, visto que ele consegue se ligar nos resíduos de citosina e mudar a sua conformação, deixando o DNA mais lábil para a etapa de desnaturação, facilitando a hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA dos isolados, otimizando as etapas de amplificação (NAGAI; YOSHIDA; SATO, 1998). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR Multiplex A e B e o tamanho de seus respectivos produtos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados na Multiplex A para os sorotipos Ia, Ib, II, III e IV e Multiplex B para os sorotipos V, VI, VII, VIII e IX.

Iniciador		Sequência 5'→3'	Produto (pb)
Nome	Gene		
Ia-F	<i>cps1aH</i>	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	521
Ia-R	<i>cps1aH</i>	GTAGAAATAGCCTATATAACGTTGAATGC	
Ib-F	<i>cps1bJ/K</i>	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	770
Ib-R	<i>cps1bJ/K</i>	GAATTAACCTTCAATCCCTAAACAATATCG	
II-F	<i>cps2K</i>	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	397
II-R	<i>cps2K</i>	TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG	
III-F	<i>cps1a/2/3I</i>	TCCGTAACAACAGACTCATCC	1826
III-R	<i>cps1a/2/3J</i>	AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	
IV-F	<i>cps4N</i>	GTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT	578
IV-R	<i>cps4N</i>	CCTCCCAATTCGTCATAATGGT	
V-F	<i>cps5O</i>	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	701
V-R	<i>cps5O</i>	AACCTTCTCCTTACACTAATCCT	
VI-F	<i>cps6I</i>	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	487
VI-R	<i>cps6I</i>	CTGTCGGACTATCCTGATGAATCTC	
VII-F	<i>cps7M</i>	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT	371
VII-R	<i>cps7M</i>	GCTGGTCGTGATTCTACACA	
VIII-F	<i>cps8J</i>	AGGTCAACCACTATATAGCGA	282
VIII-R	<i>cps8J</i>	TCTTCAAATTCCGCTGACTT	
IX-F	<i>cpsI-7-9</i>	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG	229
IX-R	<i>cpsI-9</i>	AATCATCTTCATAATTTATCTCCATT	

Como controles das reações, foram utilizados *Streptococcus agalactiae* dos sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX. Os controles Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII foram caracterizados por metodologia de imunodifusão com anticorpo anticapsular de coelho, no Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Sérgio E. L. Fracalanza. O controle IX foi caracterizado por sequenciamento de um isolado clínico que amplificou para esse sorotipo na PCR multiplex B (Alves, 2018).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (120V/50 minutos), corados por brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta no equipamento ImagenQuant LAS500 (GE Healthcare, EUA). Os fragmentos e seus respectivos tamanhos, foram estimados pela comparação ao padrão de tamanho molecular de 100 pares de base (pb) (Ludwig Biotec, Brasil).

4.6 PCR para detecção dos genes constitutivos *atr* e *cfb*

Nos isolados que não amplificaram nenhum dos sorotipos por PCR Multiplex A e B, foi pesquisado dois genes constitutivos de EGB: *atr* e *cfb*, para a confirmação da identificação bacteriana.

O gene *atr* codifica a proteína transportadora glutamina gs0538, a qual é específica para a *S. agalactiae*, e por ser um gene constitutivo, a chance de ocorrência de mutações é

demasiado baixa (DE-PARIS et al., 2011). O gene *cfb* codifica o fator CAMP, caracteristicamente é uma região conservada e está presente em praticamente todos os isolados clínicos de EGB de acordo com testes fenotípicos e moleculares (KE et al., 2000). As reações de PCR para ambos genes foram executadas conforme protocolo descrito por Schörner et al. (2014), que padronizaram a reação para o gene *atr*, e as mesmas condições se mostraram adequadas para o gene *cfb*.

As duas reações foram padronizadas com volume final de 25 µL cada, utilizando tais concentrações de reagentes: 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e KCl 50 mM; 10 picomoles de cada oligonucleotídeo iniciador; 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato; 1,5 mM de MgCl₂; 2,0 µL de DNA do isolado e 1U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A amplificação dos isolados foi feita no termociclador modelo 2720 Applied Biosystems com um ciclo inicial de desnaturação de 60 segundos a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 45 s, e 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 min. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados e o tamanho dos seus respectivos produtos de amplificação estão ilustrados no quadro 2.

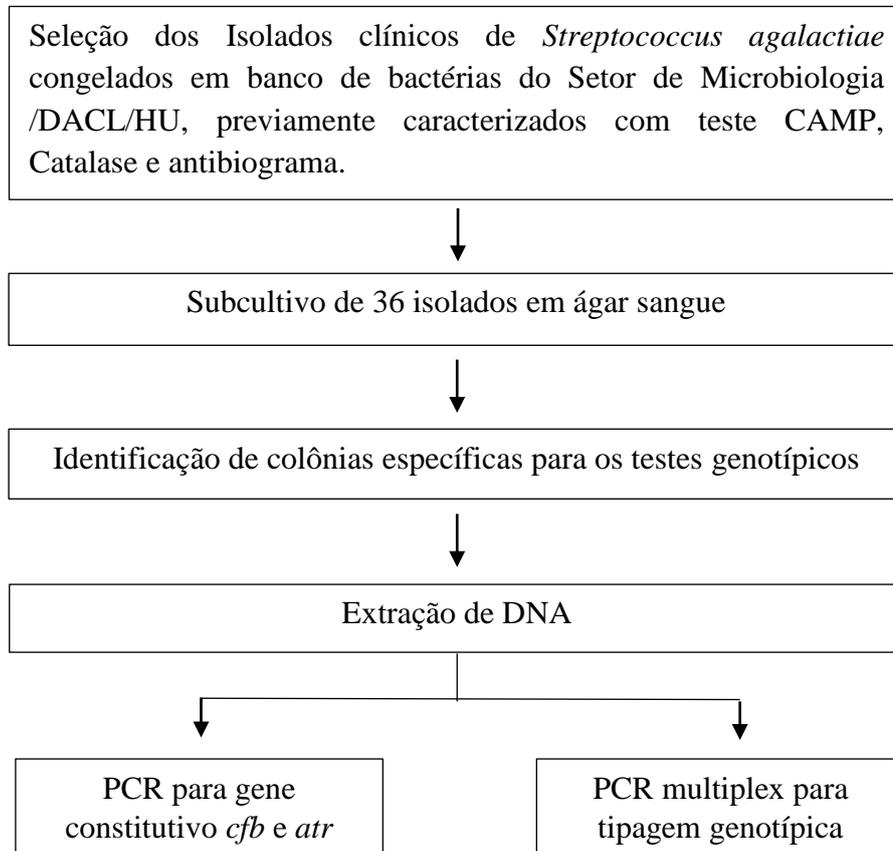
Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes *cfb* e *atr*.

Iniciador		Sequência 5' → 3'	Produto (pb)
Nome	Gene		
<i>atr</i> F <i>atr</i> R	<i>atr</i>	CAACGATTCTCTCAGCTTTGTTAA TAAGAAATCTCTTGTGCGGATTC	780
<i>Sag59</i> F <i>Sag190</i> R	<i>cfb</i>	TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT	153

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (90V/30 minutos), corados por brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV) no ImagenQuant LAS500 (GE, Healthcare, EUA). Os fragmentos e seus respectivos tamanhos foram estimados por comparação ao padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 Fluxograma de trabalho



5.2 Descrição dos isolados clínicos

Entre março de 2018 e março de 2019 foram obtidos 36 isolados clínicos de *S. agalactiae* associados à infecção, do banco de bactérias do Setor de Microbiologia da Divisão de Análises Clínicas - DACL/HU-EBSERH/UFSC.

Os 36 isolados incluídos no estudo foram obtidos de diferentes sítios anatômicos, sendo 52,9% (19/36) de tecidos¹, 17% (6/36) de sangue total, 8,3% (3/36) de urina, 2,7% (1/36) de secreção vaginal, 8,3% (3/36) de secreção de ferida, 2,7% (1/36) de aspirado articular, 2,7% (1/36) de osso, 2,7% (1/36) de *swab* de orofaringe, 2,7% (1/36) de *swab* retroauricular (Tabela 1)

¹ Foram considerados tecidos amostras de pé diabético, gangrena, tecido profundo e tecido não especificado.

Tabela 1. Relação dos sítios anatômicos com o número de isolados em cada sítio, respectivamente.

AMOSTRA CLÍNICA	Nº DE ISOLADOS
Tecido	19
Urina	3
Sangue	6
Secreção de ferida	3
Secreção vaginal	1*
Osso	1
Aspirado articular	1
Swab orofaringe	1*
Swab retroauricular	1
TOTAL	36

*Isolado de swab vaginal de gestante isolado durante seu atendimento na emergência obstétrica e swab de orofaringe do feto morto da mesma gestante, associado como causa da morte.

Em relação à faixa etária dos indivíduos, excluindo o feto morto, os demais variaram entre 18 e 76 anos. Em relação ao total de isolados 5,5% (2/36) foram obtidos de pessoas com idade menor ou igual a 18 anos, enquanto pacientes com idade entre 19 e 59 anos corresponderam a 47,2% (17/36) dos isolados, mesmo quantitativo observada na faixa etária ≥ 60 anos. Nesta faixa etária (≥ 60 anos), 70% do isolados (12/17) foram obtidos de indivíduos do sexo masculino e apenas 30% (5/17) do sexo feminino. Notou-se maior ocorrência de pacientes com idade ≥ 60 anos entre as amostras de tecido, representando 68,4% (13/19) dos isolados nesse sítio (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos sítios anatômicos com o número de isolados em cada sítio, e a faixa etária, respectivamente.

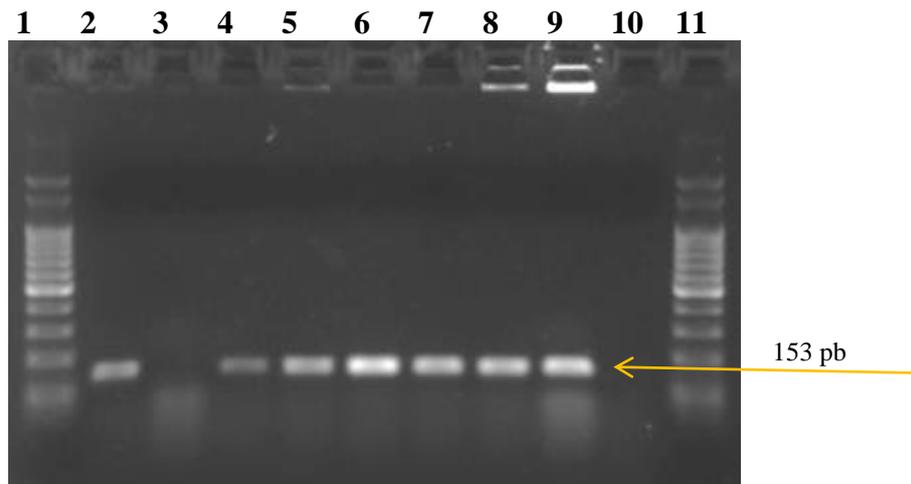
ORIGEM	TOTAL	FAIXA ETÁRIA		
		Feto e 18 anos	19 a 59 anos	≥ 60 anos
Tecido	19		6	13
Urina	3	1	2	
Sangue	6		4	2
Secreção vaginal	1		1	
Secreção ferida	3		3	
Osso	1			1
Aspirado articular	1			1
Swab orofaringe	1	1		
Swab retroauricular	1		1	
TOTAL	36	2	17	17

5.3 Detecção dos genes constitutivos *atr* e *cfb* EM *S. agalactiae*

Para os isolados que não amplificaram produtos correspondentes aos sorotipos encontrados nas reações multiplex A e B, foi realizada a detecção dos genes constitutivos *atr* e *cfb* para confirmar a ausência de inibidores da PCR. Observa-se na figura 2 que, com exceção do isolado 3, todos os fragmentos amplificaram um produto de 153 pares de base correspondente ao gene *cfb*. O isolado 3 apresentou, provavelmente, problemas de inibição da PCR. Esse isolado foi excluído do estudo em virtude de falta de tempo hábil para subcultivo, nova extração de DNA e reações de PCR.

Em relação à amplificação do gene *atr* verificou-se amplificação em todos os isolados, com exceção do isolado 3.

Figura 2. Imagem ilustrativa de um Gel de agarose representando produtos amplificados na eletroforese para o gene *cfb*

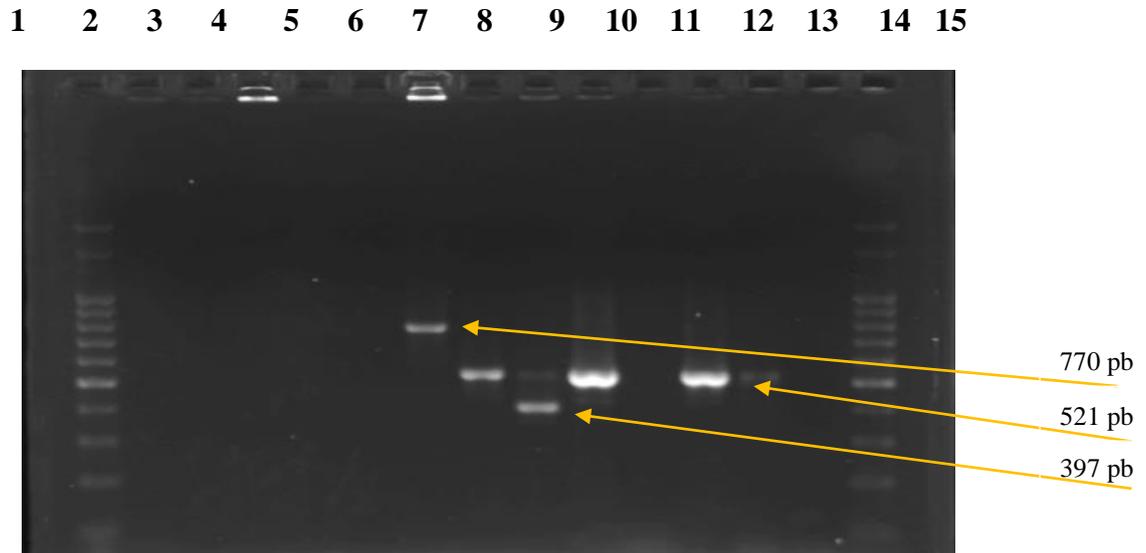


Produtos de amplificação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5% a 90V por 30 minutos, corados por brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (UV) no aparelho ImagenQuant LAS500 (GE, Healthcare, EUA). **Canaletas 1 e 11:** Padrão de tamanho molecular de 100pb (Ludwig Biotec, Brasil); **Canaleta 9:** Controle positivo (CP) para o gene *cfb* (153pb); **Canaleta 10:** Controle negativo (CN); **Canaletas 2, 4, 5, 6, 7 e 8:** Isolados que amplificaram o gene constitutivo *cfb* (153pb); **Canaleta 3:** Isolado que não amplificou o gene *cfb*.

5.4 Detecção molecular dos sorotipos capsulares de *S. agalactiae*

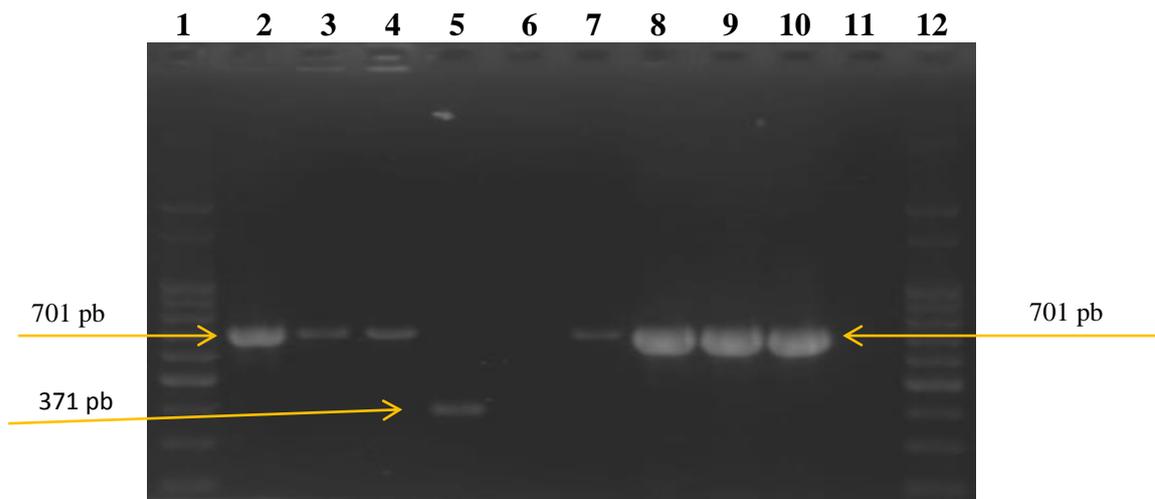
A determinação dos sorotipos realizada por PCR multiplex está caracterizada nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Gel de agarose representando produtos amplificados na eletroforese para multiplex A (Sorotipos Ia, Ib, II, III e IV para *S. agalactiae*)



Produtos de amplificação por PCR após eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 120V por 50 minutos. **Canaletas 1 e 15:** Padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil); **Canaleta 13:** Controle positivo (CP) para sorotipo Ia (521pb), utilizado como controle de especificidade para o iniciador; **Canaleta 14:** Controle negativo (CN), onde foi utilizado água no lugar do DNA; **Canaletas 7, 8, 9, 10 e 12:** Amostras de *S. agalactiae* que amplificaram para os sorotipos Ib (770pb), Ia (521pb), II (397pb), Ia e Ia, respectivamente; **Canaletas 2, 3, 4, 5, 6 e 11:** Amostras que não amplificaram os sorotipos correspondentes a multiplex A.

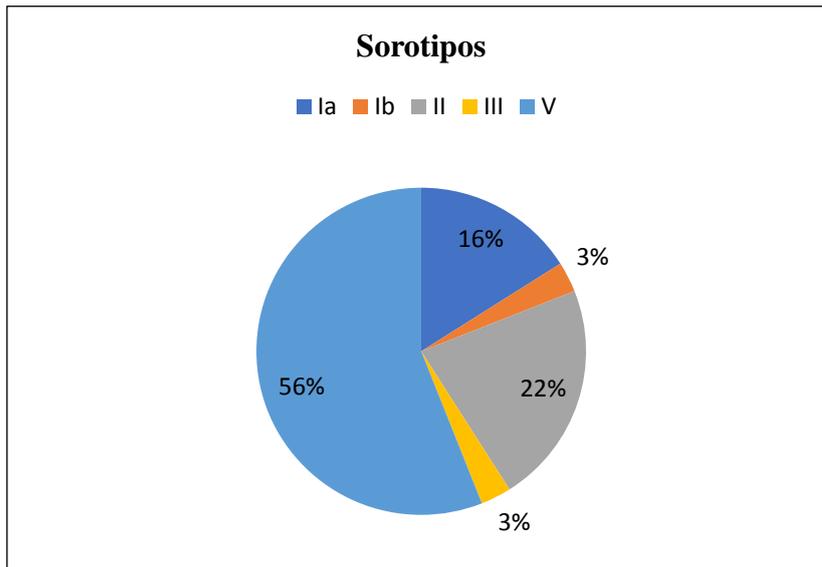
Figura 4. Gel de agarose representando produtos amplificados por eletroforese pela multiplex B (Sorotipos V, VI, VII, VIII e IX para *S. agalactiae*)



Produtos de amplificação por PCR após eletroforese em gel de agarose 1,5% a 120V por 50 minutos. **Canaletas 1 e 12:** Padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil); **Canaletas 5 e 10:** Controle positivo (CP) para sorotipo VII (371pb) e sorotipo V (701pb), respectivamente. Para controle de especificidade dos iniciadores; **Canaletas 11:** Controle negativo (CN); **Canaletas 2, 3, 4, 7, 8 e 9:** Amostras que amplificaram para sorotipo V (701 pb); **Canaleta 6:** Amostra que não amplificou para os sorotipos correspondentes do multiplex B.

Nos resultados obtidos a partir da sorotipagem o sorotipo V foi o mais encontrado, representando 56% (20/36) dos isolados do estudo, em seguida, o sorotipo II com 22% [8/36] e o sorotipo Ia 16% [6/36]. Os sorotipos Ib e III totalizaram cada um 3% (1/36). Os sorotipos IV, VI, VII, VIII e IX não foram detectados no estudo (Figura 5).

Figura 5. Distribuição percentual dos sorotipos identificados nos isolados do estudo.



Avaliando a origem dos isolados e os sorotipos detectados, os isolados de tecidos, sítio prevalente no estudo, apresentaram o sorotipo V em 63,1% (12/19), os sorotipos Ia e II 15,8% (3/19), respectivamente e o sorotipo Ib 5,26% (1/19). Quanto aos resultados relacionados a sangue total, 50% (3/6) dos isolados foram do sorotipo V, 33,3% (2/6) sorotipo II e 16,6% (1/6) sorotipo III. Em urinas, dos três isolados desse sítio, dois foram tipados como sorotipo V e um sorotipo II. Dos três isolados em secreção de ferida, dois foram sorotipo V e um sorotipo Ia. Quanto aos demais sítios anatômicos que obtiveram apenas um isolado no estudo, a origem e os sorotipos detectados foram: secreção vaginal e orofaringe (Ia), aspirado articular (V), *swab* osso (II), *swab* retroauricular (II) (Tabela 3).

Tabela 3. Origem dos isolados e seus respectivos sorotipos.

AMOSTRA CLÍNICA	TOTAL	SOROTIPOS				
		Ia	Ib	II	III	V
Tecido	19	3	1	3		13
Urina	6			2	1	3
Sangue	3			1		2
Secreção ferida	3	1				2
Secreção vaginal	1	1				
Aspirado articular	1					
Swab orofaringe	1	1				
Osso	1			1		
Swab retroauricular	1			1		
Total	36	6	1	8	1	20

6 DISCUSSÃO

Há mais de 100 anos, em 1887 foi descrito pela primeira vez *Streptococcus agalactiae* por Nocard e Nollereau como causador de Mastite bovina. Mais de 50 anos depois, em 1938 Lancefield dividiu os *Streptococcus* do grupo B previamente identificados, como Ia e Ib (LANCEFIELD, 1938).

A partir daí, o microrganismo passou a ganhar cada vez mais notoriedade como patógeno, inicialmente com Fry, que descreveu três casos fatais pós parto (DOARE; HEATH, 2013) e com o decorrer dos anos mais frequentemente passou a ser relatado como causador de doenças neonatais, especialmente sepse e meningite (PHARES et al., 2008)

Desde o nascimento, as taxas de colonização por EGB aumentam de maneira constante até a vida adulta (15-30%), o que indica que a transmissão não se dá apenas de forma perinatal, mas também de modo horizontal. Além da exposição ao microrganismo, diversos outros fatores são relevantes em relação à infecção como estresse, hábitos alimentares, uso de medicamentos, infecções relacionadas ao trato gastrointestinal e as comorbidades, fatores que alteram a composição da microbiota intestinal. (PALMER et al., 2007).

Esses fatores individuais justificam porque EGB é um causador de diferentes tipos de infecções como as teciduais, urinárias, articulares, sépticas principalmente em indivíduos maiores de 65 anos e com debilidades crônicas como doenças renais e hepáticas, câncer e acidente vascular encefálico, além de hábitos como alcoolismo e tabagismo (JACKSON et al., 1995; COMETTO et al., 2018). Síndromes clínicas graves, como meningite e endocardite são raras, mas frequentemente associadas com considerável morbidade e mortalidade (FARLEY, 2001).

Neste trabalho foram estudados 36 isolados clínicos classificados dentro de cinco dos dez sorotipos pesquisados, foram eles Ia, Ib, II, III e V. Recentemente, estudos vêm demonstrando a distribuição dos sorotipos conforme as diferentes regiões estudadas, e de um modo geral os sorotipos Ia, III e V têm maior frequência nos relatos (PERSSON et al., 2004; CAMUSET et al., 2015; ALHHAZMI et al., 2016; PINTO et al., 2017). Em estudos realizados na América do Norte, regiões da Europa e Austrália, os sorotipos mais frequentemente associados com relatos de casos, além das colonizações, foram Ia, Ib II, III e V (RAABE;SHANE 2019; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2015; IMPERI et al., 2011; FURFARO et al., 2019), enquanto o sorotipo II vem se destacando na América Latina (LOPARDO et al., 2003; PALACIOS et al., 2005).

No presente estudo os sorotipos mais frequentes foram V (56%), II (22%), Ia (16%), além de Ib e III (3%) cada, sendo que os demais sorotipos não foram identificados. Blumberg et al. (1996) obtiveram resultados semelhantes em relação aos principais sorotipos identificados, e também não identificaram nenhuma amostra para o sorotipo IV. Na região paranaense de Curitiba, Palmero et al. (2010) observaram entre os 168 isolados associados à infecção e colonização, maior prevalência do sorotipo Ia (37,4%), seguido pelo II (14,7%), IV (12,1%), Ib (11,6%) e V (11,1%), mesmos sorotipos encontrados no presente estudo, com exceção do sorotipo IV. No estudo, o sorotipo Ia foi predominante entre os isolados associados a colonização (44/111 – 39,6%), infecções não invasivas (12/37 – 32,4%) e infecções invasivas (8/20 – 40%). Em estudo também realizado no município de Florianópolis, Alves et al. (2018) descreveram os sorotipos Ia (44,2%), V (23,6%) e II (16,7%) como os mais frequentes entre 233 isolados estudados. O sorotipo Ia foi predominantemente associado a amostras de colonização de gestantes (70/139), já o sorotipo V foi o mais frequente em amostras de tecido (4/10) e de hemocultura (3/6), representando 28% dos isolados associados a infecção em adultos não gestante.

Alves et al. (2018) descreveram que 43% (10/23) dos isolados associados a infecção em gestantes/neonatos pertenciam ao sorogrupo Ia. No presente estudo, o único caso associado a gestação (*swab* da mãe do feto morto), também pertencia a esse sorogrupo, ressaltando a importância da pesquisa de EGB em gestantes, cuja colonização pode aumentar o risco de aborto e nascimento pré-maturo (HAMEDÍ et al., 2012). No estudo de Alves et al. (2018), sete isolados relacionados ao abortamento pertenciam ao sorotipo Ia, evidenciando o potencial patogênico desse sorotipo, que além de causar sérias complicações em gestantes e neonatos, mostrou-se presente também, nas infecções em adultos não gestantes. Gherardi et al. (2007) também observaram entre amostras coletadas na Itália, o predomínio do sorotipo Ia em isolados de infecções invasivas (29%). Em estudo com 177 isolados de EGB em gestantes, neonatos e adultos em hospital irlandês, o sorotipo Ia foi detectado de maneira significativa em isolados de infecções invasivas, tanto de gestantes quanto não-gestantes (MEEHAN; CUNNEY; CAFFERKEY, 2014).

O sorotipo V tem sido associado a infecções em idosos e em pacientes imunocomprometidos (PERSSON et al., 2004), sendo que no presente estudo, os pacientes com mais de 60 anos foram os mais acometidos por infecções com este sorotipo, representando 50% (10/20) dos isolados tipados por PCR. Os outros três isolados de tecido, pertencentes ao sorotipo V, foram recuperado de pacientes com idade próxima à 60 anos (55, 56 e 57 anos), fato que ressalta a idade como um fator que pode se relacionar diretamente às

infecções pelo sorotipo V. Destes dez isolados, nove foram recuperados de amostras de tecidos e três deles identificados especificamente como pé diabético, o que evidencia a relação do sorotipo com condições clínicas relacionadas a comorbidades severas ou imunossupressão.

Os isolados identificados como sorotipo II também se relacionaram com infecções invasivas, sendo em sua maioria provenientes de infecções invasivas como tecidos, osso e sangue total. Alves et al. (2018) também identificaram os sorotipos II e V como prevalentes em infecções. Dutra et al. (2014) que estudaram 434 isolados e destes, 185 associados à infecção, de várias regiões do Brasil e Palmeiro et al. (2010) que estudaram 168 isolados no Paraná, e destes, 57 associados à infecção, descreveram os sorotipos Ia e II como os mais detectados, sendo 35 e 16%, respectivamente.

Em um estudo multicêntrico com 363 isolados humanos que foram recuperados entre o período de 1980 e 2006 de três regiões brasileiras e 29 isolados de origem bovina provenientes do Rio de Janeiro, mostrou aumento na prevalência do sorotipo Ia, que com o decorrer do tempo foi de 18,9% para 25,9%. Por sua vez, o sorotipo III que segundo o estudo foi muito prevalente na década de 1980 (18,9%), chegou a ser o mais prevalente na década de 1990 (27,6%), apresentou acentuada diminuição nos últimos anos avaliados no estudo (14,2%) (DUARTE et al., 2005; PINTO et al., 2013). No presente estudo apenas um dos 36 isolados foi caracterizado como o sorotipo III, o qual foi isolado de amostra de hemocultura, corroborando a diminuição da circulação do sorotipo III entre os isolados de *S. agalactiae*, conforme citado no estudo de Pinto et al. O reduzido número de isolados e o fato do sorotipo III ser comumente relatado em infecções neonatais (TEATERO et al., 2014), principalmente em doença de início tardio e meningite (KAPATAI et al., 2017), também podem estar associados a baixa taxa de incidência deste sorotipo no estudo.

Em relação ao sorotipo Ib, foi detectado apenas em um isolado de amostra de tecido. Em estudos realizados no Brasil como o de Dutra et al., o sorotipo Ib se apresentou com maior frequência, representando 28 (15,1%) dos 185 isolados de infecção avaliados no trabalho. Ainda sobre o estudo de Dutra et al., o sorotipo Ib juntamente com Ia e II foram os mais prevalentes entre isolados associados a infecções nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste,. Alves et al., também obtiveram poucos isolados do sorotipo Ib, sendo apenas seis (8,7%) em um total de 71 para os isolados não relacionados a gestação.

Dos sorotipos que não foram detectados neste trabalho, destaque para o sorotipo IV, pelo fato de já ter sido relatado como prevalente em estudo realizado em hospital de Nova Iorque que objetivava detectar a co-colonização com múltiplos sorotipos de *S. agalactiae*

(KHATAMI et al., 2018) e também por estar emergindo como agente infeccioso (FERRIERI et al., 2013) e estar apresentando em alguns estudos, altos níveis de diversidade genética e a expansão clonal entre os diferentes sorotipos IV isolados (CAMPISI et al., 2016).

Os sorotipos VI, VII, VIII e IX não foram detectados e em alguns estudos já citados previamente e que contaram com isolados provenientes da região Sul do Brasil como o de Alves et al., Dutra et al. e Palmeiro et al., também não houve a detecção destes sorotipos. Alves et al. (2018) identificaram cinco isolados pertencentes ao sorotipo IX (5/233 – 2,1%), todos associados a infecções e colonização em gestantes e neonatos. A baixa frequência destes sorotipos também já foi relatada em regiões da Europa e América do Norte (PINTO et al., 2017; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2015; KHATAMI et al., 2018).

Conforme os resultados obtidos e os estudos analisados, tem se a variação dos sorotipos de EGB de acordo com regiões geográficas, sítios anatômicos, população estudada, além dos diversos fatores de imunossupressão. Foi possível notar a versatilidade do EGB como agente infeccioso responsável por severas condições patológicas, afetando pacientes com as mais diversas condições clínicas. Frente aos resultados e estudos citados, é importante atentar para a necessidade de vigilância epidemiológica, além de cuidados nos tratamentos estabelecidos em função da flexibilidade de sua virulência e potencial resistência antimicrobiana.

7 CONCLUSÃO

A PCR multiplex é uma ferramenta útil, se apresentando como uma boa opção para sorotipagem de *S. agalactiae*. O presente estudo permitiu classificar em sorotipos todos os isolados, caracterizados pelos genes constitutivos *atr* e *cfb*, recuperados de amostras clínicas associadas à infecção. Diferente do relatado para métodos sorológicos e por aglutinação em látex, a metodologia molecular permitiu classificar todos os isolados em seus respectivos sorotipos.

No setor de microbiologia do HU/UFSC/EBSERH, *S. agalactiae* foi predominantemente isolado em amostras de tecido (19) e partes moles (feridas 3), que representaram 61,1% dos isolados associados a infecção. A cirurgia vascular é responsável no hospital pela maioria desses pacientes, que geralmente têm necroses teciduais e amputações relacionadas ao Diabetes Mellitus. O estudo corrobora esta comorbidade como importante fator de risco para infecções por *S. agalactiae*. Outro fator de risco, constatado pelo estudo para infecções por *S. agalactiae* foi a idade, 50% dos pacientes eram idosos.

O sorotipo V foi o mais prevalente, diferente do observado em outras regiões do país, mas semelhante ao descrito em Florianópolis em estudo anterior, que também destacou esse sorotipo em amostras de tecido e hemocultura.

O sorotipo II foi o segundo mais frequente, e o que apresentou maior diversidade entre os sítios anatômicos do qual foi recuperado.

O sorotipo Ia, apesar do pequeno número nas amostras do estudo, demonstrou importância em infecções graves associadas a gestação.

Assim, os resultados do presente estudo apontam *S. agalactiae* como importante agente infeccioso especialmente em tecidos e partes moles de paciente idosos e com comorbidades. Confirma a variabilidade regional também entre os sorotipos associados a infecção, ressaltando a importância de vigilância epidemiológica para este microrganismo.

8 REFERÊNCIAS

ALHHAZMI, Areej; HURTEAU, Donna; TYRRELL, Gregory J.. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 7, p.1774-1781, 20 abr. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00355-16>.

ALVES, Eduardo Venâncio. **Determinação molecular dos sorotipos capsulares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em Streptococcus agalactiae isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário/UFSC na cidade de Florianópolis/SC**. 2018. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, 2018.

ALP, Feyza et al. Screening and genotyping of group B streptococcus in pregnant and non-pregnant women in Turkey. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, [s.l.], v. 10, n. 03, p.222-222, 31 mar. 2016. Journal of Infection in Developing Countries. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.6190>.

ARAKERE, Gayathri et al. Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serotyping of Group B Streptococcal Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.i.], v. 37, n. 8, p.2564-2567, ago. 1999.

BASTOS, André Netto et al. Streptococcus agalactiae em gestantes: incidência em laboratório clínico de Juiz de Fora (MG) - 2007 a 2009. **Hu Revista**, Juiz de Fora, Mg, v. 38, n. 3/4, p.129-134, jun. 2012.

BATISTA, Renan Pedroso; FERREIRA, Cristiane Rúbia. Streptococcus agalactiae septicemia in a patient with diabetes and hepatic cirrhosis. **Autopsy And Case Reports**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.35-43, 2015. Editora Cubo Multimidia. <http://dx.doi.org/10.4322/acr.2015.028>.

BENINCÁ, Vitor Machado et al. Perfil epidemiológico dos óbitos por sepse neonatal na macrorregião Sul de saúde catarinense no período de 1996 a 2009. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Santa Catarina, v. 42, n. 2, p.20-26, abr. 2013.

BLUMBERG, H. M. et al. Invasive Group B Streptococcal Disease: The Emergence of Serotype V. **Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 173, n. 2, p.365-373, 1 fev. 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/173.2.365>.

BRIGTSEN, Anne Karin et al. Comparison of PCR and serotyping of Group B Streptococcus in pregnant women: The Oslo GBS-study. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 108, p.31-35, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.001>.

CAMPISI, Edmondo et al. Serotype IV Streptococcus agalactiae ST-452 has arisen from large genomic recombination events between CC23 and the hypervirulent CC17

lineages. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-11, jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep29799>.

CAMUSET, Guillaume et al. Invasive Group B Streptococcal Disease in Non-pregnant Adults, Réunion Island, 2011. **International Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 35, p.46-50, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.04.006>.

COMETTO, Maria Aldana et al. Streptococcus agalactiae en adultos no gestantes. Análisis de 10 años en un Hospital Universitario. **Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba**, [s.l.], v. 75, n. 4, p.255-260, 12 dez. 2018. Universidad Nacional de Cordoba. <http://dx.doi.org/10.31053/1853.0605.v75.n4.20569>.

DARSANAKI, Reza K et al. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. **Annals Of Biological Research**, Lahijan, Iran, v. 3, n. 8, p.4189-4191, mar. 2012.

DE-PARIS, Fernanda et al. Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.323-327, jul. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70199-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70199-4).

DOARE, Kirsty Le; HEATH, Paul T.. An overview of global GBS epidemiology. **Vaccine**, [s.l.], v. 31, p.7-12, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.009>.

DUARTE, R. S. et al. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.97-103, 22 dez. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.49.1.97-103.2005>.

DUTRA, Vanusa G et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.323,12 jun. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-323>.

FARLEY, Monica m.. Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.556-561, 15 ago. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/322696>.

FERRIERI, Patricia et al. Serotype IV and Invasive Group BStreptococcusDisease in Neonates, Minnesota, USA, 2000–20101. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.551-558, abr. 2013. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1904.121572>.

FREY, Marcos Noronha et al. Streptococcus agalactiae como agente etiológico de Doença Sexualmente Transmissível. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 86, n. 6, p.1205-1207, dez. 2011.

FURFARO, Lucy L.; CHANG, Barbara J.; PAYNE, Matthew S.. A novel one-step real-time multiplex PCR assay to detect *Streptococcus agalactiae* presence and serotypes Ia, Ib, and III. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.7-12, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.003>.

FURFARO, Lucy L. et al. Group B streptococcus prevalence, serotype distribution and colonization dynamics in Western Australian pregnant women. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 5, p.728-740, 1 maio 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000980>.

GHERARDI, G. et al. Molecular Epidemiology and Distribution of Serotypes, Surface Proteins, and Antibiotic Resistance among Group B Streptococci in Italy. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 9, p.2909-2916, 18 jul. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00999-07>.

GUDJÓNSDÓTTIR, Margrét Johansson et al. Serotypes of group B streptococci in western Sweden and comparison with serotypes in two previous studies starting from 1988. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.507, 9 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1266-4>.

HÅKANSSON, Stellan et al. Novel coagglutination method for serotyping group B streptococci. **Journal Of Clinical Microbiology**, Usa, v. 30, n. 12, p.3268-3269, dez. 1992.

HAMEDI, A. et al. Evaluation of Group B Streptococci Colonization Rate in Pregnant Women and Their Newborn. **Acta Medica Iranica**, v. 50, n. 12, p. 805-808, 11.

HASHMI, Muhammad Ali et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2015, p.1-29, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/541591>.

HUANG, Y. H.; CHANG, Hsien-Chang.; CHANG, Tsung-Chain. Development of a Latex Agglutination Test for Rapid Identification of *Escherichia coli*. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Taiwan, v. 20, n. 2, p.97-103, fev. 2001.

IDLEVICH, Evgeny A. et al. Bacteriophage-Based Latex Agglutination Test for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 9, p.3394-3398, 16 jul. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01432-14>.

IMPERI, Monica et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 80, n. 2, p.212-214, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.010>.

JACKSON, L et al. Risk factors for group B streptococcal disease in adults. **Ann Intern Med**, v. 123, n. 1, p. 415-420, 1995.

JOHNSON, D; FERRIERI, P.. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 4, n. 19, p.506-510, abr. 1984.

JOHRI, Atul Kumar et al. Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. **Vaccine**, [s.l.], v. 31, p.43-45, ago. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.094>.

JÚNIOR, M. G. T. et al. Endocardite aguda por Streptococcus agalactiae: relato de caso. **Revista da SOCERJ**, v. 18, n. 5, p. 477-479, 2005.

KAPATAI, Georgia et al. Comparison of molecular serotyping approaches of Streptococcus agalactiae from genomic sequences. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.429, 1 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3820-5>.

KE, Danbing et al. Development of Conventional and Real-Time PCR Assays for the Rapid Detection of Group B Streptococci. **Clinical Chemistry**, v. 331, p. 324–331, mar. 2000.

KHATAMI, Ameneh et al. Vaginal co-colonization with multiple Group B Streptococcus serotypes. **Vaccine**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.409-411, jan. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.001>.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido/** Washington C. Winn Jr. ... [et al.] ; revisão técnica Eiler Fritsch Toros ; tradução Eiler Fritsch Toros [et al.]. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnostic microbiology. 7th. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2018.

LANCEFIELD, R. C.. LOSS OF THE PROPERTIES OF HEMOLYSIN AND PIGMENT FORMATION WITHOUT CHANGE IN IMMUNOLOGICAL SPECIFICITY IN A STRAIN OF STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS. **Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 59, n. 4, p.459-469, 1 abr. 1934. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.59.4.459>.

LANCEFIELD, R. C.. TWO SEROLOGICAL TYPES OF GROUP B HEMOLYTIC STREPTOCOCCI WITH RELATED, BUT NOT IDENTICAL, TYPE-SPECIFIC SUBSTANCES. **Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.25-40, 1 jan. 1938. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.67.1.25>.

LANÇA, Sara; SERRANO, Pedro; BARATA, José. Infecção por Streptococcus agalactiae com múltiplas focalizações – um caso clínico de evolução favorável. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, [s.i], v. 13, n. 3, p.179-183, set. 2006.

LOPARDO, H. A. et al. Six-Month Multicenter Study on Invasive Infections Due to Group B Streptococci in Argentina. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 10, p.4688-4694, 1 out. 2003. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.10.4688-4694.2003>.

MUKESI, Munyaradzi et al. The activity of commercial antimicrobials, and essential oils and ethanolic extracts of *Olea europaea* on *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.1-9, 30 jan. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-019-2445-4>.

MEEHAN, Mary; CUNNEY, Robert; CAFFERKEY, Mary. Molecular epidemiology of group B streptococci in Ireland reveals a diverse population with evidence of capsular switching. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1155-1162, 28 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2055-5>.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; A PFALLER, Michael. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 300 p. Carlos Pelleschi Taborda.

NAGAI, M; YOSHIDA, A; SATO, N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 44, n. 1, p. 157–163, 1998.

OTAGUIRI, Eliane Saori et al. Development of a melting-curve based multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae* and genes encoding resistance to macrolides and lincosamides. **Bmc Pregnancy And Childbirth**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.126, 3 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12884-018-1774-5>.

PALACIOS, G. C et al. Serotypes of 286 group B streptococci isolated from asymptomatic carriers and invasive disease cases in Mexico. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, [s.i], v. 47, n. 1, p.4-21, jan. 2005.

PALMEIRO, Jussara K. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B Streptococcal Isolates in Southern Brazil. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.4397-4403, 29 set. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00419-10>.

PALMER, Chana et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **Plos Biology**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.177-177, 26 jun. 2007. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>.

PANIKKATH, Deepa et al. Streptococcus Agalactiae Pyomyositis in Diabetes Mellitus. **Baylor University Medical Center Proceedings**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.290-291, jul. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08998280.2016.11929439>.

PARK, C. H. et al. Detection of Group B Streptococcal Colonization in Pregnant Women Using Direct Latex Agglutination Testing of Selective Broth. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.408-409, 1 jan. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.1.408-409.2001>.

PERSSON, E. et al. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001. **Clinical Microbiology And**

Infection, [s.l.], v. 10, n. 9, p.791-796, set. 2004. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00931.x>.

PHARES, Christina R.. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. **Jama**, [s.l.], v. 299, n. 17, p.2056, 7 maio 2008. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.299.17.2056>.

PIMENTEL, B. A. S. et al. Streptococcus agalactiae infection in cancer patients: a five-year study. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.927-933, 18 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2617-9>.

PINTO, Tatiana Castro Abreu et al. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine Streptococcus agalactiae strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.131-136, mar. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.006>.

PINTO, Ana Mafalda et al. Incidence and serotype characterisation of Streptococcus agalactiae in a Portuguese hospital. **Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 71, n. 6, p.508-513, 27 nov. 2017. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204646>.

POYART, C. et al. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.1985-1988, 21 mar. 2007. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00159-07>.

RAABE, Vanessa N.; SHANE, Andi L.. Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae). **Microbiology Spectrum**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.1-13, 22 mar. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0007-2018>.

SANTORO-LOPES, Guilherme; HALPERN, Márcia; GONÇALVES, Renato Torres. Perinephric abscess caused by Streptococcus agalactiae after renal transplantation. **Journal Of Infection**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.145-147, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2004.11.008>.

SCHORNER, Marcos Andre et al. Detection of Group B Streptococcus agalactiae from Anorectal and Vaginal Screening Tests. **Clinical Microbiology: Open Access**, [s.l.], v. 03, n. 05, p.169-169, 2014. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000169>.

SOARES, Georgia Cristina Tavolaro et al. Prevalence of Group B Streptococcus serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.869-872, set. 2013. Fap UNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000300032>.

STEVENS, Dennis L; KAPLAN, Edward L. **Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis**. Nova York: Oxford University Press; 2000.

SUTTISUNHAKUL, Vichaya et al. Evaluation of Polysaccharide-Based Latex Agglutination Assays for the Rapid Detection of Antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 93, n. 3, p.542-546, 2 set. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0114>.

TEATERO, S. et al. Characterization of Invasive Group B Streptococcus Strains from the Greater Toronto Area, Canada. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.1441-1447, 19 fev. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03554-13>.

ULETT, K. B. et al. Diversity of Group B Streptococcus Serotypes Causing Urinary Tract Infection in Adults. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 47, n. 7, p.2055-2060, 13 maio 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00154-09>.

UNNIKRISHNAN, Dileep et al. Case of acute paraspinal pyomyositis in an elderly diabetic secondary to spread from urinary tract infection. **Bmj Case Reports**, [s.l.], p.1-6, 23 ago. 2018. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bcr-2018-225739>.

USEIN, Codruța-romanița et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Streptococcus agalactiae* strains recovered from female carriers in the Bucharest area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 109, n. 2, p.189-196, mar. 2014. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140431>.

YAO, K. et al. Capsular Gene Typing of *Streptococcus agalactiae* Compared to Serotyping by Latex Agglutination. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.503-507, 28 nov. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02417-12>.

YA'QOUB, Lina et al. *Streptococcus Agalactiae* Infective Endocarditis in a Healthy Middle-aged Man: Uncommon but Life-threatening. **Cureus**, [s.l.], p.2632, 16 maio 2018. Cureus, Inc.. <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.2632>

